

22. Nes W. R. Role of sterols in membranes. — *Lepids*, 1974, v. 9, N 8, p. 596—612.
23. Oparin A. J., Gelman S., Deborin G. A. The significance of structure in certain enzymic processes. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1957, v. 68, p. 582—591.
24. Phaff H. J. A new method of collecting *Drosophila* by means of sterile bait. — *Amer. Nat.*, 1955, v. 89, p. 53—54.
25. Phaff H. J., Miller M. W., Recca J. A., Shifrine M., Mrak E. M. Studies on the ecology of *Drosophila* in the Yosemite region of California. Yeasts found in alimentary canal of *Drosophila*. — *Ecology*, 1956, v. 37, p. 533—538.
26. Royes W. V., Robertson F. W. The nutritional requirements and growth relations of different species of *Drosophila*. — *J. Exper. Zool.*, 1964, v. 156, p. 105—135.
27. Sang J. H. The quantitative nutritional requirements of *Drosophila melanogaster*. — *J. Exp. Biol.*, 1956, v. 33, p. 45—73.
28. Sang J. H., King R. S. Nutritional requirements of *Drosophila melanogaster* adults. — *J. Exp. Biol.*, 1961, v. 38, p. 793—809.
29. Tatum E. L. Nutritional requirements of *Drosophila melanogaster*. — *Proc. Acad. Sci. Nat.*, 1939, v. 25, p. 409—497.
30. Thompson M. J., Svoboda J. A., Kaplanis J. N., Robins W. E. Metabolic pathways of steroids in insects. — *Proc. Roy. Soc.*, 1978, v. 180, p. 203—221.
31. Wagner R. P. The nutrition of *Drosophila mulleri* and *Drosophila aldrichi*. — *Univ. Tex. Publ.*, 1944, v. 4445, p. 104—128.
32. Woods R. A., Bard M., Gardner I. E., Molzahn S. W. Studies on the accumulation of ergosterol and 24(28)-dehydroergosterol in 3 strains of *Saccharomyces cerevisiae*. — *Microbios*, 1974, v. 10, A, p. 73—80.

ДЕЙСТВИЕ ПОВЫШЕННОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ИОНОВ НАТРИЯ И МАГНИЯ НА ТРАНСЛЯЦИОННОМ И ПОСТТРАНСЛЯЦИОННОМ УРОВНЯХ У ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Н. П. МИХАЙЛОВА, Б. В. СИМАРОВ,
В. Л. ТИХОМИРОВА, С. Г. ИНГЕ-ВЕЧТОМОВ

Процесс реализации наследственной информации осуществляется в несколько этапов: синтез РНК на ДНК (транскрипция), посттранскрипционная доработка РНК (так называемый процессинг), трансляция РНК на рибосомах, в результате чего синтезируются полипептиды и затем их различные посттрансляционные модификации, приводящие к созданию нормально функционирующих молекул. Еще недавно считали, что все структуры, участвующие на разных этапах этого процесса, функционируют с достаточно высокой точностью и нарушение точности можно наблюдать только в результате мутаций.

Однако в последнее время накопилось большое число работ, где авторы указывают, что на всех уровнях реализации генетической информации могут происходить ошибки. В одних случаях (транскрипция и трансляция) такая неоднозначность является следствием поливариантности матричных процессов [2, 4, 5], когда нарушается точность считывания отдельных триплетов, в других различные изменения в процессе посттранскрипционной и посттрансляционной доработки макромолекул приводят к искажению передаваемой генетической информации. Экспериментальные данные последних лет говорят в пользу того, что поливариантность, приводящая к неоднозначности, в норме существует в клетке [25], причем ее можно усилить мутациями в генах, контролирующих структуры, которые принимают участие в реализации генетической информации, или различными внешними воздействиями [29,

Изучение генотипической и фенотипической супрессии мутаций позволило подойти к раскрытию механизмов контроля точности процесса реализации генетической информации, а также понять, как функционируют структуры, участвующие в этом процессе.

Плодотворным экспериментальным подходом для достижения этой цели можно считать использование генетических моделей, сенситивизированных к различным изменениям генотипической или внешней среды. Это позволяет выявлять в эксперименте более четкие эффекты исследуемых воздействий. Такому требованию удовлетворяет, в частности, использование линий и культур так называемого псевдодиплоидного типа, возникшего, например, вследствие таких генетических взаимодействий, как супрессия или межallelная комплементация.

В данной работе будут представлены результаты изучения влияния повышенной концентрации NaCl , MgSO_4 и глицерина на проявление мутаций у дрожжей. Выбор воздействий был обусловлен следующими соображениями. Известно, что ионы магния индуцируют неоднозначность трансляции в эукариотических бесклеточных системах [33, 34], а 1 М NaCl и 3 М глицерина используют при выявлении «осмотически исправляемых» мутантов [7, 19]. Предполагается, что механизм исправления этих мутантов обусловлен действием данного агента на уже синтезированные полипептидные цепи.

Использование гаплоидных и диплоидных штаммов дрожжей, содержащих различные по своей природе мутации в гене *ade2*, предоставило в наше распоряжение, кроме общепринятого метода изучения фенотипической супрессии, еще две дополнительные тест-системы. Так, привлечение гетероallelных по *ade2* гибридов позволяет выявить, благодаря наличию межallelной комплементации в этом локусе, такие эффекты различных воздействий, которые не обнаруживаются у генетически однородного фермента гаплоидов.

У диплоидов, содержащих сочетания неполярнокомплемнтирующих аллелей *ade2* с нонсенс-аллелями или неидентифицированными как нонсенсы (некомплемнтирующими либо полярными) аллелями *ade2*, наряду с супрессорами разной кодоновой специфичности, можно по изменению характера комплементации в присутствии супрессора изучать взаимодействие супрессоров с нонсенс-мутациями. Фактически, используя такие штаммы, мы можем контролировать изменения, происходящие на уровне трансляции.

В данной работе мы покажем, что такое тестирование позволяет разграничить некоторые механизмы фенотипической супрессии.

Материалы и методы. В работе использовались Петергофские генетические линии дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [3]. Коллекция состояла из 259 мутантов по гену *ade2* и 58 — по гену *ade1*, полученных под действием разных мутагенов. Все мутанты имели тип спаривания «а».

Мутанты по гену *ade1* использовали в качестве позитивного контроля, так как известно, что среди них ранее найдены два предполагаемых нонсенс-мутанта, растущих на минимальной среде с повышенной концентрацией ионов магния [4].

В тестах на межallelную комплементацию использовали восемь гаплоидов «а» типа спаривания — веронные тестеры [15].

Гаплоидные штаммы, несущие доминантные нонсенс-супрессоры трех типов, способные транслировать кодоны: I-УАА, II-УГА и III-УАГ в сочетании с несупрессируемой аллелью *ade2*: 1-П3072 и 3-П3072 (α *ade2*-209^{sup}trp^h 1-1^{sup}SUP⁵¹), 5-П2389 и 6-П2389 (α *ade2*-163^{sup}his 1-1^{sup}SUP 101¹¹) и R-100-2-П712 (α *ade2*-163^{sup}his 7-1^{sup}lys 2-A12¹¹SUP 101¹¹) [13] и несущие несупрессируемую аллель *ade2*-163 контрольный штамм без супрессора 2-П712 (α *ade2*-163^{sup}his 7-1^{sup}lys 2-A12¹¹) (римские цифры справа над номерами генов и аллелей соответствуют типам нонсенсов и нонсенс-супрессоров).

Ревертанты по гистидину и лизину были получены у штамма:

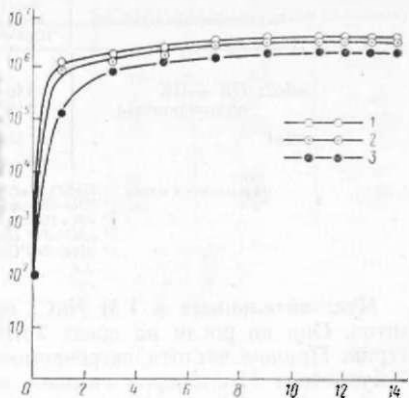
9-П712 (генотип см. выше) и по аргинину у штаммов: 46-П3116, 42-П3116, 30-П3116, 8-П3116 (α ade 2-163^{nsb} arg X-1^{II} his 7-1^I leu 2-2^I met 1^{nsb}). Ревертанты получали также из штаммов 71-П3146 и 87-П3146 (α ade 2-163^{nsb} arg X-1^{II} his 7-1^I leu 2-2^I lys 2-A12^{III}).

Для поддержания культур и для скрещивания использовали полную агаризованную среду УАРД. Тесты на межаллельную комплементацию проводили на минимальной агаризованной среде. Для отбора ревертантов использовали селективные среды с добавкой аденина, гистидина, лизина, лейцина, метионина и аргинина (по 20 мг на 1 л среды). Состав сред опубликован ранее [3]. Среда с повышенным содержанием ионов магния и натрия отличалась от минимальной только тем, что содержали по 1 М $MgSO_4$ (120 г/л) или NaCl (58 г/л) соответственно. Один литр стандартной минимальной среды содержит 0,5 г $MgSO_4$, а NaCl вообще не входит в состав сред для дрожжей. Выбор таких концентраций солей был обусловлен полученными ранее данными о их влиянии на проявление мутаций в генах *ade1* и *ade2* [4, 9]. Минимальная среда с глицерином содержала 3 М глицерина (294 г/л). Постановка опытов на межаллельную комплементацию и комплементацию, индуцированную супрессором, описана ранее [6, 15].

Для изучения динамики роста штамма 15В-П4 использовали упорядоченный посев культуры на плотной среде [18]. Через определенные интервалы времени вырезали из агара одну колонию и суспензировали в определенном количестве воды. Оптическую плотность суспензии определяли на фотокolorиметре. Количество клеток в 1 мм³ определяли по калибровочной кривой.

Температура инкубирования 30°C.

Статистическую обработку результатов проводили методами χ^2 и



Кривые роста штамма дикого типа 15В-П4 при разных условиях культивирования.

1 — минимальная среда; 2 — минимальная среда с 1 М $MgSO_4$; 3 — минимальная среда с 1 М NaCl; размер точек соответствует 99,9% доверительным интервалам.

Принятые сокращения. а и α — аллели локуса типа спаривания; *ade*, *his*, *lys*, *arg*, *leu*, *met* — мутации, приводящие к потребности в аденине, гистидине, лизине, аргинине, лейцине, метионине соответственно; SUP — доминантная супрессорная мутация, *nsb* — несупрессируемая и *sb* — супрессируемая аллели; МАК — межаллельная комплементация; МАКНС — межаллельная комплементация, индуцируемая супрессором; НК — некомплементирующие, ПК — полярнокомплементирующие, ИПК — неполярнокомплементирующие мутации.

Результаты. Проявление мутаций аденинзависимости. Изучение динамики роста штамма дикого типа 15В-П4 (исходного для всех использованных в работе аденинзависимых мутантов) показало, что этот штамм растет на среде с 1 М $MgSO_4$ так же, как и на обычной минимальной, а на среде с 1 М NaCl наблюдалось незначительное снижение роста (рисунок).

Данные о росте аденинзависимых мутантов по генам *ade1* и *ade2* при повышенной концентрации ионов магния и натрия в минимальной среде представлены в табл. 1. Ни один из 140 ПК мутантов не рос на этих средах. Среди 119 одноверонных (вероятно, миссенс-мутантов) обнаружено достоверное различие в частоте индукции роста на средах с Mg^{2+} и Na^{+} : на среде с $MgSO_4$ росли три мутанта, а на среде с $NaCl$ — 21 мутант. Из 58 мутантов по гену *ade1* на среде с магнием росли два: p14-15B-П4 (а *ade1*-14) и p22-15B-П4 (а *ade1*-22). Эти штаммы, а также p437-15B-П4 (а *ade1*-437) росли на среде с $NaCl$.

Таблица 1

Рост аденинзависимых мутантов на минимальной среде с различными добавками

Характеристика мутантов	Число исслед. мутантов	Рост мутантов при добавке	
		1 М $MgSO_4$	1 М $NaCl$
<i>ade2</i> : НК + ПК	140	3	0
одноверонные	119	3	21
<i>ade1</i>	58	2	3

Примечание. χ^2 $MgSO_4/NaCl$ (однов.) = 12,0 $p < 0,001$
 χ^2 НК + ПК/однов. ($MgSO_4$) = 1,7 $0,25 > p > 0,10$
 χ^2 НК + ПК/однов. ($NaCl$) = 24,5 $p < 0,001$
 $ade1/ade2$ ($MgSO_4$) = 0,5 $0,50 > p > 0,25$
 $ade1/ade2$ ($NaCl$) = 0,2 $0,75 > p > 0,50$

Чувствительными к 1 М $NaCl$ оказались 18 аденинзависимых мутантов. Они не росли на среде YAPD при повышенной концентрации натрия. Причем частота встречаемости таких мутаций в гене *ade1* (6 мутантов) достоверно выше, чем в гене *ade2* (9 мутантов) ($\chi^2 ade1/ade2 = 7,8$; $p < 0,001$). Некоторые из этих мутантов росли на минимальной среде с повышенной концентрацией Na^{+} . Этот класс мутантов не был подвергнут дальнейшему анализу.

Межаллельная комплементация в локусе *ade2*. Известно, что характер комплементации в локусе *ade2* чувствителен к действию различных факторов, таких, как, например, температура инкубирования [8], неконтролируемые изменения состава культуральных сред [10, 11], концентрация ионов металлов [9, 12]. Мутационные изменения в белке-мультимере при МАК не исчезают, а маскируются в результате исправления конформации или за счет других механизмов МАК. При комбинаторике по-разному мутантных субединиц возникает «семейство» молекул гибридного белка-мультимера с несколько различающимися конформациями. Воздействия среды на МАК позволяют в некоторых случаях активировать и тем самым выявить гибридные ферменты, не активные в обычных условиях, а также изменить характер синтеза полипептидных цепей, которые в дальнейшем входят в состав белка-мультимера. Таким образом, при испытании даже одного компаунда фактически проверяется целое семейство родственных гибридных белков.

Мы изучали МАК в гене *ade2* для 64 гетероаллельных гибридов на минимальной среде с 1 М $NaCl$, для 143 — на среде с 1 М $MgSO_4$ и для 23 — на среде с 3 М глицерина (табл. 2). В табл. 2 приведено число комбинаций аллелей *ade2*, содержащих разные типы мутаций; в примечании — число некомплементирующих компаундов, для которых мы в принципе могли бы обнаружить индукцию МАК, в числителе — количество обнаруженных случаев индукции МАК. В наших опытах не

выявили индукцию МАК при повышенной концентрации ионов или глицерина. Наши результаты не противоречат данным Павленко и Сойдлы [9], об обнаружении индукции комплементации в локусе *ade2* при повышенной концентрации ионов магния, потому что, во-первых, мы использовали разные наборы компаундов по гену *ade2*. (Авторы [9] проверили, в основном, сочетания НПК аллелей, а мы — компаунды НПК с ПК или НК аллелями.) Во-вторых, суммарно для всех исследованных компаундов в наших опытах и в опытах Павленко, Сойдлы [9] различие недостоверно ($\chi^2 = 0,5; 0,75 > p > 0,5$).

Таблица 2

Межаллельная комплементация и межаллельная комплементация, индуцируемая доминантными супрессорами I, II и III типов на минимальной среде и с различными добавками

Тест	Сочетания аллелей	Рост гибридов при добавке		
		1 М NaCl	1 М MgSO ₄	3 М глицерина
МАК	НПК × НПК	0	0	Не исслед.
		13	13	
	НПК × (НК + ПК)	0	0	0
		51	130	23
МАКиС	НПК × (НК + ПК) в присутствии доминантных супрессоров	15	69	0
		768	994	253

Примечание. χ^2 MgSO₄/NaCl (МАКиС) = 22,0 $p < 0,001$
 χ^2 МАК/МАКиС (MgSO₄) = 9,3 $p < 0,001$
 χ^2 МАК/МАКиС (NaCl) = 0,4 $0,75 > p > 0,50$
 χ^2 NaCl/глицерин (МАКиС) = 4,2 $0,05 > p > 0,01$
 χ^2 MgSO₄/глицерин (МАКиС) = 21,4 $p < 0,001$

Однако мы обнаружили, что на среде с 1 М NaCl иногда происходит подавление роста гибрида при комплементации, что никогда не отмечалось для 1 М MgSO₄ или 3 М глицерина.

Межаллельная комплементация в локусе *ade2* в присутствии доминантного нонсенс-супрессора. Ранее было показано, что МАК в гене *ade2* в присутствии нонсенс-супрессора специфически меняется в зависимости от типа супрессора и его кодоновой специфичности [6, 13]. Использование МАКиС позволило выявить три типа нонсенс-мутаций в гене *ade2*. По изменению характера комплементации можно судить о влиянии различных факторов на супрессию нонсенс-мутаций у дрожжей.

173 нонсенс-мутанта по гену *ade2*, в том числе: 137 — I типа, 20 — II и 16 — III типа, скрестили с набором штаммов, несущих доминантные нонсенс-супрессоры. Полученные диплоиды содержали гетероаллельные сочетания по *ade2*: *ade2-163^{nsb}* × *ade2-209^{nsb}* × *ade2-НК^{sb}* × *ade2-ПК^{sb}* и супрессор I, II или III типа. Нонсенс-мутации по характеру комплементации относятся к НК или ПК, поэтому при скрещивании соответствующих мутантов с НПК мутантами гибриды не растут на минимальной среде. Как можно видеть из табл. 2, рост таких гибридов (без супрессора) не индуцируется в наших опытах на средах с повышенной концентрацией ионов магния, натрия или глицерина. Однако введение в подобные гибриды специфических нонсенс-супрессоров индуцирует комплементацию. Причем она индуцируется в соответствии с кодоновой специфичностью нонсенс-супрессора. Отметим, что не всегда супрессоры подавляют проявление всех мутаций соответствующего типа. Это может быть обусловлено либо недостаточной эффективностью доминантного супрессора, либо тем, что аминокислота, которую ставит

супрессорная тРНК при чтении нонсенс-кодона, не приводит к комплементированию или приводит к негативной комплементации [16]. Однако на среде с магнием или натрием процент комплементации, индуцированной супрессором, увеличивался, причем на среде с магнием достоверно чаще. Глицерин не влиял на комплементацию в гене *ade2* в присутствии доминантного супрессора. Отметим, однако, что при повышенной концентрации глицерина в минимальной среде рост некоторых гибридов стимулировался (но не индуцировался) по сравнению с минимальной средой.

Действие магния и натрия отличается не только по числу случаев индукции МАК в присутствии супрессора. Существует некоторая специфичность действия этих факторов. Так, у ряда гетероаллельных гибридов магний индуцирует рост, а натрий — нет (и наоборот).

Поскольку в своей работе мы использовали одномолярные концентрации солей магния и натрия, то можно предполагать, что причиной нарушенных эффектов является высокое осмотическое давление. Однако наличие 3 М глицерина в минимальной среде не влияло на характер комплементации как без супрессора, так и в присутствии доминантного супрессора. Изменение величины осмотического давления путем снижения наполовину концентрации NaCl , MgSO_4 и глицерина не давало существенных различий в характере комплементации по сравнению с 1 М NaCl , 1 М MgSO_4 и 3 М глицерина. Эти факты заставляют нас думать, что не осмотическое давление, возникающее при таких высоких концентрациях агентов, а изменение концентрации ионов является тем фактором, под действием которого увеличивается эффективность нонсенс-супрессии, поскольку действие NaCl и MgSO_4 отличается от действия глицерина.

В случае специфического действия ионов магния одним из наиболее вероятных механизмов, приводящих к эффекту супрессии мутаций, которые в норме не супрессируются данным супрессором, можно считать нарушение точности передачи генетической информации при трансляции, так как известно, что ионы магния играют важную роль в этом процессе [17], а повышение концентрации приводит к повышению частоты ошибок трансляции в бесклеточных системах [33, 34].

Известно, что способность стрептомицина повышать эффективность действия нонсенс-супрессоров зависит от генотипа [32]. Для того, чтобы установить, влияет ли генотипический фон на функционирование супрессора в присутствии ионов магния, необходимо иметь набор разных штаммов, несущих один и тот же супрессор. С этой целью были получены ревертанты у амбер-мутанта *ade2-924*. Затем каждый ревертант скрестили со штаммом 2-П712. Сегреганты из этих гибридов, несущие несупрессируемую мутацию *ade2-163* и супрессор, были испытаны в тесте на комплементацию с набором нонсенс-мутантов всех трех типов. Сегреганты из одного гибрида, т.е. несущие один и тот же супрессор, проявляли разную способность к комплементации как на минимальной среде, так и на минимальной среде с повышенной концентрацией ионов магния. Это означает, что в результате рекомбинации генетических факторов при скрещивании у сегрегантов подбирается различный генотипический фон, влияющий на эффективность супрессии.

МАКтС оказывается не только удобной для выявления нонсенс-мутации в гене *ade2*, но и весьма чувствительной к действию различных генотипических, так и фенотипических факторов.

В тестах на МАКтС мы изучаем нонсенс-супрессию опосредованную, через изменение характера комплементации, поэтому необходимо работать не с одним штаммом, а с набором штаммов, несущих разные

супрессоры, проявляющие одинаковую аллельную специфичность, чтобы выявить все возможные нонсенс-мутации одного типа. С этой целью были получены ревертанты по гистидину, лизину и аргинину. Всего было исследовано 433 ревертанта, полученных у штаммов 71-П3146, 87-П3146, 2-П712, 8-П3116, 42-П3116, 46-П3116, 30-П3116, несущих несупрессируемую аллель *ade2-163*. Затем ревертанты были испытаны в тесте на МАКис, аналогично тому, как описано выше. Используя метод F_{α} , мы обработали результаты этого теста. Сравнивали данные для каждого штамма по числу ревертантов, дающих комплементацию с определенным типом нонсенса. Различие было недостоверное, что позволило нам рассматривать суммарные данные для всех семи штаммов. Получив дополнительно нонсенс-супрессоры, мы выявили, наряду с увеличением эффективности супрессии при повышении концентрации ионов магния, изменение кодоновой специфичности супрессоров. При высокой концентрации ионов магния наблюдали индукцию МАК, когда гибриды несли супрессоры, неспецифические для данного типа нонсенс-мутации.

Таблица 3

Влияние ионов магния на нонсенс-супрессию у дрожжей-сахаромикетов

Тип нонсенс-супрессора	Тип нонсенс-кодона		
	I (УАА)	II (УГА?)	III (УАГ)
I	53	4 368	14 424
II	0 271	29 597 (31%)	7 266
III	0 537	1 410	82 153 (53%)

Примечание. F_{α} УГА/УАГ (SUP^I) = 4,9 $0,05 > p > 0,01$
 F_{α} УАА/УАГ (SUP^{II}) = 12,1 $p < 0,001$
 F_{α} МА/УАА (SUP^{III}) = 2,2 $0,75 > p > 0,5$

В табл. 3 суммированы данные всех опытов, в которых мы изучали влияние ионов магния на способность супрессоров индуцировать МАК. В числителе — количество исследованных комбинаций аллелей *ade2*, в которых супрессор не индуцировал комплементацию на минимальной среде, а в знаменателе — количество гетероаллельных сочетаний *ade2*, для которых МАК в присутствии супрессора индуцировалась только при высокой концентрации ионов магния.

Можно видеть, что ионы магния повышают эффективность нонсенс-супрессоров всех трех типов, причем она возрастает в ряду УАА → УГА → УАГ. Кроме того, как мы уже указывали, ионы магния не только увеличивают эффективность нонсенс-супрессоров, но и изменяют специфичность супрессоров всех трех типов. Так, выявлено, что УАА-супрессоры только при повышенной концентрации ионов магния подавляли в 14 случаях из 424 возможных неспецифические для них мутации УАГ, и в 4 из 368 — УГА-мутации, т. е. достоверно реже ($F_{\alpha} = 4,9$; $0,05 > p > 0,01$). УГА-супрессоры подавляли в этих условиях неспецифически УАГ-, но не УАА-мутации, и обнаружен только один случай, когда УАГ-супрессор подавлял неспецифически мутацию УГА.

Изменение кодоновой специфичности супрессоров обнаружено в присутствии ионов магния, но не натрия или глицерина. Эти факты, на наш взгляд, позволяют считать, что повышенная концентрация ионов,

создаваемая 1 М $MgSO_4$, может, при наличии генотипического супрессора, рассматриваться в качестве фенотипического супрессора нонсенс-мутаций у эукариотических микроорганизмов — дрожжей-сахаромикетов, действующего на уровне трансляции.

Обсуждение. В данной работе описана тест-система для изучения действия агентов, модифицирующих реализацию генетической информации, на трансляционном и посттрансляционном уровнях. У дрожжей-сахаромикетов, обладающих устойчивыми гапло- и диплофазами, на гаплоидном уровне действие агентов, затрагивающих трансляцию, называется преимущественно в модификации проявления нонсенс-мутаций. На этом фоне большая активность при модификации проявления миссенс-мутаций указывает на действие агента на посттрансляционном уровне. Контролем к сделанным выводам служат результаты, полученные на диплодах. Модификация МАК является следствием действия агента на готовые белковые молекулы или на сборку фермента. Если в присутствии трансляционного супрессора агент обладает дополнительным действием на комплементацию, это свидетельствует о действии его на трансляцию.

Уже на гаплоидном уровне мы выявили различия в действии $MgSO_4$ и $NaCl$ на проявление мутаций. Если НК и ПК мутации не изменяли свое проявление в этих условиях, то некоторые одновверонные, вероятно, миссенс-мутанты, реагировали на добавление в среду $MgSO_4$ или $NaCl$ (см. табл. 1). Соответствующие мутанты росли на минимальной среде без аденина в присутствии 1 М $MgSO_4$ или $NaCl$. Как мы уже упоминали, так называемые осмотически исправляемые мутанты чаще выявляются на среде с 1 М $NaCl$. Частота «осмотически исправляемых», растущих на 1 М $NaCl$ мутантов в гене *ade2*, составляет 8%, это достоверно не отличается от данных Нашеда и Джэба [30], которые выявили 15% «осмотически исправляемых» среди мутантов по этому же гену. Кроме того, действие ионов натрия на одновверонные (вероятно, миссенс) мутации достоверно отличалось от действия на НК и ПК мутанты (большинство из них — нонсенс-мутанты). В случае $MgSO_4$ такое различие недостоверно (табл. 1). Из данных ряда авторов известно, что «осмотически исправляемые» мутанты действительно, как правило, относятся к НПК миссенс-мутантам [22, 23]. Эти факты заставляют нас думать, что в основе действия $NaCl$ на проявление мутаций у гаплоидных штаммов дрожжей в отсутствие генотипического супрессора лежит механизм, аналогичный тому, который приводит к «осмотическому исправлению» мутаций другими воздействиями, такими, как глицерин, этиленгликоль, KCl и т.д. Так называемое «осмотическое исправление» возможно только, когда образуются мутационно измененные полипептидные цепи (в случае миссенс-мутации), но не тогда, когда отсутствует часть полипептидной цепи (в случае нонсенс-мутации). Что касается деталей механизма, вызывающего такой эффект, то следует признать, что фенотипическая супрессия мутаций осмотическим давлением в настоящее время — малопонятное и труднообъяснимое явление. Это отмечают и другие авторы, изучавшие «осмотически исправляемые» мутанты у микроорганизмов [27, 28].

Кроме того, мы обнаружили, что 1 М $NaCl$ повышает иногда эффективность нонсенс-супрессии, не изменяя при этом специфичность супрессоров: 3 М глицерина не влияли, однако, на эффективность супрессии. Это говорит о том, что $NaCl$ является также специфическим агентом, действующим на трансляцию.

В случае $MgSO_4$ фенотипическое исправление одновверонных (миссенс) мутаций осуществляется, вероятно, в результате взаимодействия агента с молекулами фермента АИР-карбоксилазы, кодируе-

мого геном *ade 2*. Ионы магния, кроме того, могут также влиять и на трансляцию как миссенс-, так и нонсенс-мутаций. Миронова и Хромов-Борисов ранее (цит. по: [4]) обнаружили рост двух предполагаемых нонсенс-мутантов по гену *ade 1* на минимальной среде с высокой концентрацией ионов магния. Мы в опытах подтвердили их результаты.

Изучение супрессии нонсенс-мутаций позволило нам делать одно-значные выводы о механизме фенотипической супрессии ионами магния. Используя метод МАКиС, мы обнаружили, что характер комплементации мутаций зависит не только от типа вводимого супрессора, но и от состава среды. На средах с 1 М $MgSO_4$ обнаружили индукцию комплементации в присутствии супрессора для тех комбинаций аллелей *ade 2*, которые на минимальной среде не комплементировали. Вероятно, наличие в среде высокой концентрации ионов магния повышает эффективность супрессии. Помимо того, что ионы магния индуцируют неоднозначность в белоксинтезирующих бесклеточных системах [33, 34], была показана фенотипическая супрессия нонсенов *in vitro*. Так, например, Капекки показал, что при высокой концентрации ионов магния в экстрактах *Escherichia coli*, не содержащих супрессорные тРНК, снимается полярный эффект амбер-мутации в гене оболочки у РНК-содержащего вируса [17, 20]. Аналогичные результаты *in vitro* получены Манлейем и Гастеландом, которые обнаружили супрессию УАГ-мутаций ионами магния [26]. Все эти факты заставляют думать, что ионы магния играют важную роль в трансляции, по крайней мере, нонсенс-кодонах и, как показывают приведенные данные, не только в бесклеточных системах.

Таблица 4

**Неправильное чтение нонсенс-кодонов *in vivo*
при повышенной концентрации стрептомицина [32]
и ионов магния**

Объект и агент	<i>Escherichia coli</i> + фэг + стрептомицин			<i>Saccharomyces cerevisiae</i> + ионы магния		
	УАА	УАГ	УГА	УАА	УАГ	УГА
УАА	+	+	+	++	+	+
УАГ	+	+	0	+	+	+
УГА	+	0	+	0	+	+

Примечание. + — тип кодона читается в норме супрессоров; ++ — читается супрессором только при повышенной концентрации стрептомицина или ионов магния (не менее чем в 3% случаев); + — редко читается в присутствии стрептомицина. Читается при добавке ионов магния не менее чем в 0,2% случаев, но не более чем в 3%; 0 — не читается вовсе в данных условиях.

Мы показали также (см. табл. 3), что ионы магния могут не только повышать эффективность супрессии, но и изменять кодоновую специфичность супрессоров. При повышенной концентрации ионов магния супрессоры транслировали неспецифические для них нонсенс-кодоны. Известно, что стрептомицин, увеличивающий неоднозначность *in vitro*, увеличивает эффективность супрессии, а также влияет на специфичность супрессоров [32]. Результаты, полученной группой Горини [25], изучавшей влияние стрептомицина на точность трансляции, и наши результаты указывают не только на сходство уровней действия этих агентов, но и скорее всего на сходство самих механизмов.

В табл. 4 приведены результаты Стринни и Брикмана [32] по изучению супрессии нонсенс-мутаций в гене *lacZ E. coli* в присутствии стрептомицина. Для сравнения даны наши результаты. Данные этой

таблицы наглядно демонстрируют возможность неоднозначной трансляции нонсенс-кодонов в присутствии стрептомицина или ионов магния. В этих условиях супрессоры УАА, как у прокариот, так и у эукариот, способны транслировать два других типа нонсенсов: УАГ и УГА. У бактерий охр-супрессоры иногда слабо супрессируют кодоны УАГ [34]. Согласно гипотезе неоднозначного соответствия Крика [21] о спаривании кодона мРНК и антикодона тРНК вполне допустимо прочтение УАА-супрессором кодона УАГ. Стрептомицин и магний усиливают неоднозначность, вытекающую из этой гипотезы. Тем не менее, как стрептомицин, так и магний индуцировали ошибочное прочтение кодона УГА во втором положении, что никогда не допускалось гипотезой Крика. Подобная, не объяснимая гипотезой Крика, неоднозначность обнаружена и для других типов супрессоров. Согласно Горини [25], в присутствии стрептомицина может одновременно неправильно читаться только одно основание в 5' положении или в середине кодона, но не два основания. Как мы видим, это правило соблюдается у бактерий (см. табл. 4). Однако, в присутствии повышенной концентрации ионов магния у дрожжей оказывается возможным неправильное прочтение одновременно двух оснований в кодоне (табл. 4). Отметим также, что характер ошибок, вызываемых стрептомицином и ионами магния *in vitro* на матрице полиУ, различен: в присутствии ионов магния включается преимущественно лейцин, а в присутствии стрептомицина — изолейцин. В настоящее время трудно объяснить, чем обусловлены различия. Это может быть связано как со спецификой объектов, так и со спецификой использованных агентов.

Таким образом, в данной статье представлены результаты о влиянии повышенной концентрации ионов магния, натрия а также осмотического давления на точность реализации генетической информации у дрожжей. Созданная нами экспериментальная модель позволяет разграничить некоторые механизмы фенотипической супрессии мутаций и может быть использована для первичной оценки действия различных факторов внешней среды на разные этапы реализации генетической информации.

Авторы благодарят Т. Р. Соидлу за критические замечания и ценные советы в ходе выполнения и обсуждения данной работы.

Summary

A test-system of yeast *Saccharomyces cerevisiae* (haploids carrying missense and nonsense-mutations of *ade2* gene and diploids heteroallelic for *ade2*) was created to discriminate between environmental agents acting at different levels of realization of genetic information.

In haploids sodium ions (at high concentration) displayed more efficient modification activity than magnesium ions. The first agent influenced the expression of missense-mutations, revealing its action on post-translational level. No effect of high concentrations of sodium and magnesium ions on IAC for alleles under investigation was found. At the same time in diploids, which contained both noncomplementing *ade2* alleles (one was missense and a dominant suppressor these ions changed the mode of translation. Magnesium ions possessed stronger action than sodium ions because they changed the codon specificity of dominant suppressors.

It is proposed to show that the series of the tests proposed can discriminate between various levels of phenotypic suppression.

УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Петров-Восточный С. Г. Новые генетические линии дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Докл. Ленингр. ун-та. 1963, № 4, с. 117—129.
2. Петров-Восточный С. Г. Точность реализации генетической информации. — Докл. АН СССР, 1969, № 8, с. 25—30.
3. Петров-Восточный С. Г. Влияние некоторых групп соединений у Петер-

- гофских генетических линий дрожжей. — Генетика, 1971, т. 7, № 9, с. 113—116.
4. Инге-Вечтомов С. Г. Принцип поливариантности матричных процессов. — В кн.: Исследования по генетике. Л., 1976, № 7, с. 3—19.
 5. Инге-Вечтомов С. Г., Кожин С. А., Симаров Б. В., Сойдла Т. Р. Неоднозначность действия гена. — В кн.: Исследования по генетике. Л., 1971, № 4, с. 13—36.
 6. Инге-Вечтомов С. Г., Симаров Б. В. Связь суперсупрессии и межallelной комплементации в локусе *ade2* у *Saccharomyces cerevisiae*. — В кн.: Исследования по генетике. Л., 1967, № 3, с. 127—148.
 7. Левченко А. Б. Изучение генетических и биохимических основ устойчивости дрожжей-сахаромикетов к полиновым антибиотикам. Автореф. канд. дис. Л., 1979, 25 с.
 8. Михайлова Н. П., Сойдла Т. Р. Температурные модификации межallelной комплементации в локусе *ade2* у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. — Генетика, 1978, т. 14, № 6, с. 969—974.
 9. Павленко В. В., Сойдла Т. Р. Влияние повышенной концентрации ионов K^+ и Mg^{2+} на межallelную комплементацию у дрожжей. — Генетика, 1967, т. 3, № 1, с. 136—142.
 10. Рущенко Е. П. Изменчивость комплементации в локусе *ade2* у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Автореф. канд. дис. Л., 1976, 23 с.
 11. Рущенко Е. П., Сойдла Т. Р. Модификации межallelной комплементации в локусе *ade2* у *Saccharomyces cerevisiae* при выращивании дрожжей на малом количестве питательной среды. — Генетика, 1976, т. 12, № 2, с. 168—170.
 12. Симаров Б. В., Михайлова Н. П., Тюлякова Т. С., Сойдла Т. Р. Использование дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для выявления комплекса биологических воздействий агентов, загрязняющих биосферу. Матер. засед. секции генетич. аспектов проблемы «Человек и биосфера». МНТС при ГКНТ СМ СССР, Ереван, 1976, с. 20.
 13. Симаров Б. В., Шабунгов Б. Е., Царькова С. А. и др. Доминантная нонсенс-супрессия у дрожжей. Тезисы докл. III съезда ВОГиС. Л., 1977, с. 419.
 14. Снедекор Д. У. Статистические методы в применении к исследованиям в сельском хозяйстве и биологии. М., 1961.
 15. Сойдла Т. Р., Инге-Вечтомов С. Г., Симаров Б. В. Межallelная комплементация в локусе *ade2* у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. — В кн.: Исследования по генетике. Л., 1967, № 3, с. 148.
 16. Сойдла Т. Р., Тер-Аванесян М. Д., Симаров Б. В. и др. Негативная комплементация в локусе *ade2* у дрожжей-сахаромикетов. — В кн.: Исследования по генетике. Л., 1976, № 6, с. 90—108.
 17. Спирин С. А. О механизме работы рибосом. — ДАН, 1968, т. 179, № 6, с. 1467—1470.
 18. Хромов-Борисов Н. Н. Упорядоченный посев как метод изучения роста и мутирования микроорганизмов. — В кн.: Тезисы докладов III конференции молодых специалистов «Механизмы биологических процессов». Л., 1973, с. 42.
 19. Шауки А. Ш. Х. Изучение мутантов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, полученных под действием 6-гидроксилантопурина. Автореф. канд. дис. Л., 1975, 25 с.
 20. Sacchetti M. R. Polarity in vitro. — J. Mol. Biol., 1967, v. 30, p. 213—218.
 21. Crick F. H. C. Codon-anticodon pairing the wobble hypothesis. — J. Mol. Biol., 1966, v. 19, p. 548—555.
 22. Denis-Duphil M., Lacroute F. Fine structure of *ura 2* locus in *Saccharomyces cerevisiae*. In vivo complementation studies. — Mol. Gen. Genet., 1971, v. 112, N 4, p. 354—364.
 23. Foley I. M., Giles W. H., Roberts C. F. Complementation at the adenylsuccinase locus in *Aspergillus nidulans*. — Genetics, v. 52, N 6, 1965, p. 1247—1263.
 24. Garrod A. Sense and nonsense in the genetic code. — Science, 1968, v. 160, p. 149—150.
 25. Gorini L. Streptomycin and the misreading of genetic code. — In: Ribosomes 2. Cold Spring Harbor Lab., 1974, p. 791—803.
 26. Manley L. L., Gesteland R. F. Suppression of amber mutants in vitro by low temperature. — J. Mol. Biol., 1978, v. 125, N 4, p. 433—447.
 27. Martin C. E., DeBusk A. G. Temperature sensitive, osmotic remedial mutants of *Neurospora crassa*. I. Osmotic pressure induced alterations of enzyme stability. — Mol. Gen. Genet., 1975, v. 136, p. 31—40.
 28. Metzenberg R. L. Repair of multiple defects of a regulatory mutant of *Neurospora crassa* by high osmotic pressure and by reversion. — Arch. Biochem. Biophys., 1968, v. 125, N 2, p. 532—541.
 29. Monose H., Gorini L. Genetic analysis of streptomycin dependence in *Escherichia coli*. — Genetics, 1971, v. 67, p. 19—27.
 30. Nashed N., Jabbur G. A genetic and functional characterization of adenine

- mutants induced in yeast by 1-nitroso-imidazolidone-2 and nitrous acid. — Z. Vererbungsl., 1966, v. 98, p. 106—110.
31. Rosset R., Gorini L. A ribosomal ambiguity mutation. — J. Mol. Biol., 1969, v. 39, N 1, p. 93—112.
 32. Strigini R., Brickman E. Analysis of specific misreading in *Escherichia coli*. — J. Mol. Biol., 1973, v. 75, p. 659—665.
 33. Surguchov A. P., Fominykh E. S., Berestetskaya Iu. V. e. a. Recessive suppression in yeast *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by a ribosomal mutation. — FEBS Letters, 1980, v. 111, p. 175—178.
 34. Weinstein I. R., Friedman S. M., Ochoa M. Jr. Fidelity during translation of the genetic code. — Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1966, v. 31, p. 671—681.

ВЛИЯНИЕ ГЕРМЕТИЗАЦИИ И ПЕРЕГРУЗОК НА КЛЕТКИ РАЗЛИЧНЫХ МУТАНТНЫХ ШТАММОВ ХЛАМИДОМОНАДЫ

В. И. ХРОПОВА, Т. И. ИВАНОВА, К. В. КВИТКО,
Г. А. ПРОШНИКОВА, А. А. ФИЛАТОВ

Изучение влияния экстремальных факторов на живые организмы позволяет определить норму реакции генотипа и выявить оптимальный режим существования организмов особенно в тех случаях, когда речь идет об искусственных экологических системах.

Одноклеточные зеленые водоросли давно рассматриваются как возможный компонент замкнутых экологических систем. Чаще других зеленых водорослей в соответствующие эксперименты вовлекают хлореллу. Обладая рядом таких несомненных достоинств, как относительная неприхотливость при культивировании, быстрота размножения и богатые генетические коллекции мутантов, она, однако, не универсальна как объект исследований. К числу недостатков хлореллы, ограничивающих возможности ее применения в качестве компонента замкнутой системы, следует отнести такие ее биологические особенности, как неподвижность клеток, способность усваивать только связанные формы азота, а также агамный способ размножения. Последняя особенность исключает применение мощного по своим разрешающим возможностям метода гибридологического анализа.

Хламидомонада — другой представитель зеленых водорослей — позволяет благодаря особенностям жизненного цикла снять ряд из отмеченных выше ограничений и рекомендовать ее в качестве модельного объекта не только для решения таких фундаментальных проблем, как фотосинтез, генетика клеточных органелл, но и для изучения биологических компонентов замкнутых систем, тем более, что изучение хламидомонады относительно выше, чем у других водорослей.

Здесь будут представлены результаты, позволяющие охарактеризовать нормы реакции одноклеточной водоросли хламидомонады на различные перегрузки (5000 g), на малые перегрузки (5 g) оценить роль герметизации культивирования как фактора сопровождающих экологических экспериментов.

Материал и методика. В качестве исследуемого материала были взяты различные штаммы из коллекции хламидомонады в лаборатории